

УДК 604:615.371
<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2019-19-2-72-80>

ШИФР СПЕЦИАЛЬНОСТЬ
03.01.06 Биотехнология (в том числе бионанотехнологии)



ДНК- и РНК-вакцины: современное состояние, требования к качеству и особенности проведения доклинических исследований

А. А. Горяев^{1,*}, М. В. Савкина¹, Ю. И. Обухов¹, В. А. Меркулов^{1,2}, Ю. В. Олефир¹

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Научный центр экспертизы средств медицинского применения»

Министерства здравоохранения Российской Федерации,
Петровский б-р, д. 8, стр. 2, Москва, 127051, Российская Федерация

²Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования

«Первый Московский государственный медицинский университет им. И. М. Сеченова»

Министерства здравоохранения Российской Федерации,
Трубецкая ул., д. 8, стр. 2, Москва, 119991, Российская Федерация

Обзор посвящен ДНК- и РНК-вакцинам, возможность использования которых была показана еще в конце XX века. При этом до сих пор ни одна вакцина, основанная на использовании бактериальных плазмид и мРНК, не нашла применения в практике здравоохранения для профилактики инфекционных заболеваний. Но, несмотря на это, интерес к вакцинам, действующим веществом которых являются рекомбинантные нуклеиновые кислоты, сохраняется из-за возможности их быстрой разработки, малозатратного производства, безопасности технологии и возможности активации клеточного и гуморального иммунитета. Последние технологические достижения в значительной степени преодолели проблемы низкой иммуногенности, нестабильности и трудности доставки при применении ДНК- и РНК-вакцин у человека. Цель работы — изложение основных стратегий создания ДНК- и РНК-вакцин, предназначенных для профилактики инфекционных заболеваний, обобщение требований к оценке их качества и проведению доклинических исследований. Представлены общие принципы создания плазмидных векторов, кодирующих протективные антигены. Описаны новые технологии создания ДНК-вакцин, плазмиды которых кодируют геном аттенуированного вируса (iDNA и PPLAV). Приведены стратегии создания РНК-вакцин на основе мРНК и самоамплифицирующихся РНК. Представлены современные регуляторные требования к выбору необходимых показателей качества и общим принципам проведения доклинических исследований ДНК- и РНК-вакцин.

Ключевые слова: вакцина; ДНК-вакцина; плазида; мини-кольцевые ДНК; РНК-вакцина; мРНК; РНК-репликон; самоамплифицирующиеся РНК; иммунизационная ДНК; PPLAV

Для цитирования: Горяев АА, Савкина МВ, Обухов ЮИ, Меркулов ВА, Олефир ЮВ. ДНК- и РНК-вакцины: современное состояние, требования к качеству и особенности проведения доклинических исследований. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2019;19(2):72–80. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2019-19-2-72-80>

Контактное лицо: Горяев Артем Анатольевич; goryaev@expmed.ru

DNA and RNA Vaccines: Current Status, Quality Requirements and Specific Aspects of Preclinical Studies

A. A. Goryaev^{1,*}, M. V. Savkina¹, Yu. I. Obukhov¹, V. A. Merkulov^{1,2}, Yu. V. Olefir¹

¹Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products,
8/2 Petrovsky Blvd, Moscow 127051, Russian Federation

²I. M. Sechenov First Moscow State Medical University,
8/2 Trubetskaya St, Moscow 119991, Russian Federation

This review focuses on DNA and RNA vaccines whose potential use was first considered at the end of the 20th century. However, not a single bacterial plasmid-based or mRNA vaccine has been used since that time in public healthcare for the prevention of infectious diseases. Nevertheless, vaccines containing recombinant nucleic acids as the active ingredient still attract interest due to the possibility of rapid development, low-cost production, safety of the technology and the potential to activate cellular and humoral immunity. Recent technological advances have largely overcome the problems of low immunogenicity, instability, and difficulties with the delivery of DNA and RNA vaccines in humans. The aim of this review was to present the main strategies of development of DNA and RNA vaccines designed to prevent infectious diseases, and to summarise requirements for the quality control and preclinical studies. The article examines the general principles of creation of plasmid vectors encoding protective antigens. It describes new technologies used in the creation of DNA vaccines with plasmids encoding an attenuated virus genome (iDNA and PPLAV), and RNA vaccines based on mRNA and self-amplifying RNAs. The article presents current regulatory requirements for the choice of quality parameters to be tested and the general principles of preclinical studies of DNA and RNA vaccines.

Key words: vaccine; DNA vaccine; plasmid; mini-circle DNA; RNA vaccine; mRNA; RNA replicon; self-amplifying RNA; iDNA; PPLAV

For citation: Goryaev AA, Savkina MV, Obukhov Yul, Merkulov VA, Olefir YuV. DNA and RNA vaccines: current status, quality requirements and specific aspects of preclinical studies. *BIOPreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie = BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2019;19(2):72–80. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2019-19-2-72-80>

Corresponding author: Artem A. Goryaev; goryaev@expmed.ru

Сокращения: АПК — антигенпрезентирующая клетка (antigen presenting cell, APC); дцДНК — двухцепочечная ДНК (double-stranded DNA, dsDNA); кДНК — комплементарная ДНК; ВАС — бактериальная искусственная хромосома (bacterial artificial chromosome); IRES — участок внутренней посадки рибосомы (internal ribosome entry site); МНС — главный комплекс гистосовместимости (major histocompatibility complex); PAMP — патоген-ассоциированные молекулярные паттерны (pathogen-associated molecular patterns); TLR — Толл-подобные рецепторы (Toll-like receptor); UTR — нетранслируемые области (untranslated regions); VEGF — фактор роста эндотелия сосудов (vascular endothelial growth factor).

Возможность использования плазмидной ДНК и мРНК для индуцирования клеточного и гуморального иммунного ответа была показана еще в начале 1990-х годов [1–5]. Применение данных технологий представлялось очень перспективным для профилактики инфекционных заболеваний в силу простоты создания подобных векторов, кодирующих протективные антигены. Но, несмотря на проведение более 500 различных клинических исследований¹ за более чем 25 лет, ни одна ДНК- или РНК-вакцина не была зарегистрирована и разрешена к применению у людей для профилактики инфекционных заболеваний [5–9]. В настоящее время лицензированы только три препарата в ветеринарии (Арекс-ИНН, LifeTide® SW5, ONCEPT) и один генотерапевтический лекарственный препарат для медицинского применения (Неоваскулген®)², действующим веществом которых являются плазмиды, что может свидетельствовать о безопасности данной технологии [10, 11].

Основными проблемами применения ДНК-вакцин, выявленными в ходе клинических исследований, являлись низкая трансфекция клеток человека *in vivo*, слабая иммуногенность и необходимость повторных бустерных вакцинаций высокими дозами ДНК. Главными проблемами использования мРНК были нестабильность молекулы и неэффективность ее доставки. Но, несмотря на это, ДНК- и РНК-вакцины продолжают вызывать значительный интерес из-за возможности активации гуморального и клеточного иммунитета, простоты их производства, стабильности при высоких температурах по сравнению с традиционными вакцинами, что позволит отказаться от соблюдения холодовой цепи.

Цель работы — изложение основных стратегий создания ДНК- и РНК-вакцин, предназначенных для профилактики инфекционных заболеваний, обобщение требований к оценке их качества и проведению доклинических исследований.

В работе не рассматриваются вопросы использования плазмид и РНК для создания препаратов, направленных для профилактики и/или лечения неинфекционных заболеваний, в качестве векторов в генной или клеточной терапиях, а также ДНК- и РНК-вакцины, полученные путем химического синтеза.

ДНК-вакцины

В связи с отсутствием общепринятого определения под ДНК-вакцинами в статье будут пониматься вакцины, действующим веществом которых являются рекомбинантные плазмиды, содержащие ген или гены, кодирующие один или несколько протективных антигенов, и способные стимулировать иммунный ответ против инфекционного заболевания.

Как правило, в плаزمиде помимо трансгена содержатся эукариотические промоторы, обеспечивающие высокий уровень экспрессии протективных антигенов, энхансеры транскрипции (например, интрон А или SV40), сайты полиаденилирования

и терминации транскрипции. Кроме того, плазмиды содержат гены резистентности к антибиотикам, являющиеся селективными маркерами, и сайты репликации, обеспечивающие увеличение копийности в бактериальной клетке [4, 7, 9, 11, 12].

ДНК-вакцины, содержащие несколько трансгенов в одной плазмиде, получают путем создания полицистронных векторов, обеспечивающих коэкспрессию трансгенов в *cis*-положении [5]. Достижение мультигенной коэкспрессии в таких плазидах может достигаться путем использования независимых промоторов для каждого трансгена, IRES, трансляционных/посттрансляционных модификаций, «саморасщепляющихся» пептидов или получения гибридного (слитого) белка [12, 13].

Общий механизм действия ДНК-вакцин представлен на рисунке 1. Считается, что презентация антигена может происходить тремя возможными механизмами:

- 1) плазмидная ДНК экспрессируется в соматических клетках (например, миоцитами) и представляется их МНС класса I CD8⁺ Т-клеткам;
- 2) АПК (например, дендритные клетки), привлеченные к месту инъекции, трансфицируются плазмидной ДНК, и экспрессированные антигены представляются Т-клеткам через МНС класса I и МНС класса II;
- 3) АПК фагоцитируют трансформированные соматические клетки, что приводит к перекрестному праймированию и презентации антигена как CD4⁺, так и CD8⁺ Т-клеткам. Поскольку соматические клетки не способны представлять антиген через МНС класса II Т-хелперным клеткам, прямое или косвенное представление АПК является наиболее вероятным путем [12].

Также введение ДНК-вакцин может приводить к активации врожденного иммунитета за счет распознавания PAMP, например неметилированные CpG-мотивы или дцДНК [12, 14]. Еще одним из возможных способов повышения эффективности ДНК-вакцин является включение в плазмиду генов цитокинов, хемокинов, иммуностимулирующих молекул или ингибиторов иммуносупрессивных путей [12].

Мини-кольцевые ДНК

Одна из стратегий модификаций плазмид направлена на исключение «ненужных» бактериальных последовательностей (маркеры селекции и *ori* сайты) в клетке человека, но с сохранением экспрессируемой конструкции за счет образования мини-кольцевой ДНК. Мини-кольцевые ДНК получают из исходной плазмиды с использованием различных рекомбиназных систем (фаговая интеграза, *phiC31*-рекомбиназа, *Flp*-рекомбиназа, *ParA*-резолваза и *Cre*-рекомбиназа) или посредством сайт-специфической рекомбинации. Считается, что применение мини-кольцевых ДНК позволит упростить доставку в клетки человека за счет меньшего размера вектора, повысить экспрессию антигена, так как в некоторых случаях *ori* сайты способны к сайленсингу трансгена, увеличить персистенцию

¹ <https://clinicaltrials.gov>

² <http://grls.rosminzdrav.ru>

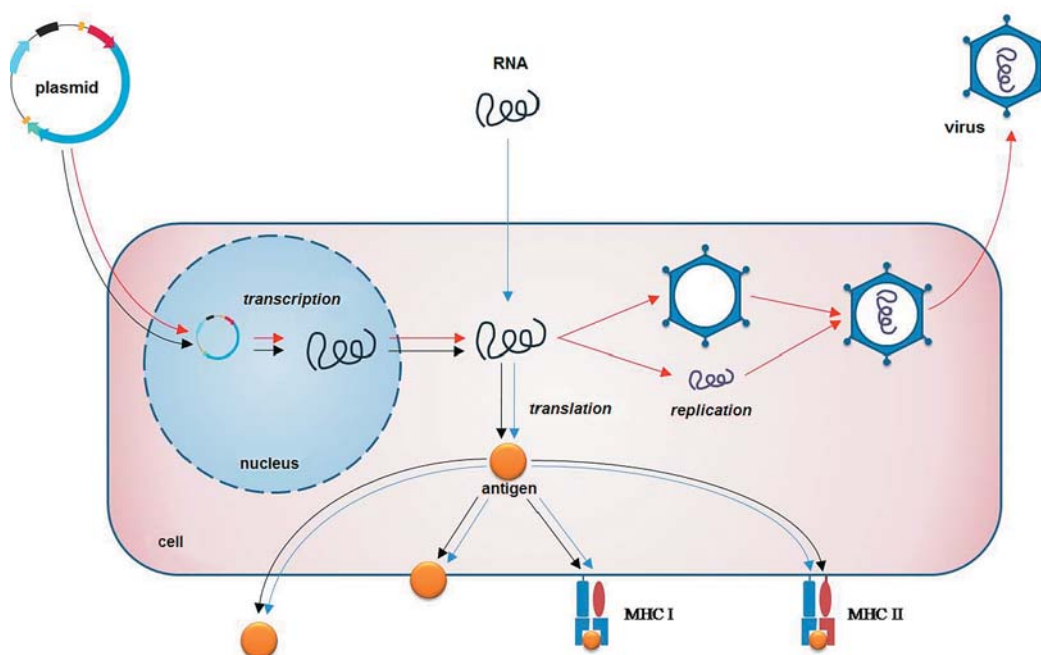


Рис. 1. Схематическое изображение механизма действия ДНК- и РНК-вакцин:

- механизм действия ДНК-вакцин: в ядре трансформированных клеток происходит транскрипция с образованием мРНК, кодирующая последовательность антигена. мРНК транспортируется в цитоплазму, в которой происходит трансляция. Синтезированный белок может секретироваться через аутокринные, паракринные или эндокринные механизмы из клетки либо процессироваться с последующим связыванием и представлением белками МНС I (всеми клетками) и МНС II (только АПК);
- механизм действия ДНК-вакцин, кодирующих аттенуированный вирус: в ядре трансформированных клеток происходит транскрипция с образованием инфекционной вирусной РНК, способной инициировать ограниченную репликацию аттенуированного вируса;
- механизм действия РНК-вакцин: экзогенная РНК проникает в клетку за счет клеточно-специфических механизмов (например, макропиноцитоз в незрелых дендритных клетках), в которой происходит ее трансляция с использованием клеточного механизма синтеза белка. Синтезированный белок может секретироваться через аутокринные, паракринные или эндокринные механизмы из клетки либо процессироваться с последующим связыванием и представлением белками МНС I (всеми клетками) и МНС II (только АПК).

Fig. 1. Schematic presentation of the mechanism of action of DNA and RNA vaccines:

- mechanism of action of DNA vaccines: transcription that takes place in the nucleus of transformed cells results in the formation of mRNA encoding the antigen sequence. The mRNA is transported to the cytoplasm where translation takes place. The synthesised protein may be secreted from the cell via autocrine, paracrine, or endocrine mechanisms, or be processed with subsequent binding and presentation by MHC I proteins (all cells) and MHC II proteins (only APCs);
- mechanism of action of DNA vaccines encoding an attenuated virus: transcription that takes place in the nucleus of transformed cells results in the formation of infectious viral RNA which is capable of initiating limited replication of the attenuated virus;
- mechanism of action of RNA vaccines: exogenous RNA penetrates into the cell by means of cell-specific mechanisms (e.g. macropinocytosis in immature dendritic cells), then the RNA translation takes place with the aid of the cell mechanism of protein synthesis. The synthesised protein may be secreted from the cell via autocrine, paracrine, or endocrine mechanisms, or be processed with subsequent binding and presentation by MHC I proteins (all cells) and MHC II proteins (only APCs).

в организме человека. Также это повысит безопасность применения за счет уменьшения потенциальной возможности интеграции вектора в геном, снижения возможной иммуно-токсичности и риска горизонтального переноса генов антибиотикорезистентности в клетки микробиоты человека [5, 15–17].

Технология мини-кольцевых ДНК активно используется в разработке новых методов лечения неинфекционных заболеваний, но для профилактики инфекционных заболеваний не получила широкого развития. В настоящее время ведется разработка только одной перспективной вакцины для профилактики и лечения лейшманиоза — LEISHDNAVAX [18].

ДНК-вакцины, плазмиды которых кодируют геном аттенуированного вируса

Еще одним из направлений совершенствования ДНК-вакцин является использование плазмид для *in vivo* доставки в клетки человека кДНК генома аттенуированных

одноцепочечных (+/–)РНК вирусов. Так, компания Medigen, Inc. (США) разработала технологию «иммунизационной» ДНК (iDNA, immunization DNA) на основе рекомбинантной ВАС, которая кодирует полноразмерную геномную РНК аттенуированного вируса под промотором цитомегаловируса и фланкированную цис-регуляторными элементами [19]. После введения в клетку iDNA происходит транскрипция с образованием геномной РНК аттенуированного вируса. Вирусная РНК инициирует ограниченную репликацию вируса в клетке с последующей сборкой, созреванием и выходом вируса (рис. 1). В настоящее время данная технология применяется для разработки вакцин для профилактики различных вирусных инфекций, вызываемых альфавирусами (вирусы Чикунгунья и венозного энцефаломиелита лошадей) и флавивирусами (вирусы Денге, Зика, японского энцефалита и желтой лихорадки) [19, 20].

Еще одной подобной технологией является PLLAV³ (plasmid launched live attenuated virus), разрабатываемая исследовательской группой проф. J. Neyts из Левенского католического университета (Бельгия). Как и в iDNA, в PLLAV в качестве вектора используется ВАС [21]. Возможность применения технологии PLLAV была показана на примере клонирования аттенуированного вируса желтой лихорадки штамма 17D. Индуцированный иммунный ответ на введение PLLAV-YFV17D оказался сопоставим с ответом на введение лицензированной вакцины Stamaril® на различных видах животных⁴. Отличительной особенностью PLLAV от iDNA является возможность создания химерных конструкций вирусной кДНК, в которую могут быть встроены гетерологичные последовательности других вирусов [21]. Доказательство данной концепции уже продемонстрировано на нескольких видах животных с использованием химерных PLLAV, содержащих антигены вирусов японского энцефалита, гепатита В, Зика и бешенства. Разрабатываемая гибридная вакцина RABYD-VAX⁵ против бешенства и желтой лихорадки финансируется программой «Horizon 2020» (Восьмая рамочная программа Европейского союза по развитию научных исследований и технологий). Еще одним возможным применением подобных технологий является их использование в производстве традиционных живых вирусных вакцин, что, возможно, позволит сократить материально-технические затраты и повысить стабильность получения вакцин.

Преимуществами вакцин, плазмиды которых кодируют геном аттенуированного вируса, являются: 1) высокая иммуногенность, сопоставимая с применением живых вирусных вакцин; 2) генетическая стабильность; 3) быстрая разработка подобных вакцин; 4) возможность введения целевых мутаций для повышения безопасности и иммуногенности; 5) масштабируемость производства, основанного на культивировании *E. coli*, и отсутствие необходимости использования клеточных культур или куриных эмбрионов; 6) возможность хранения без использования холодной цепи; 7) безыгольное применение. Недостатками же являются отсутствие вакцинных штаммов многих патогенных вирусов, трудности в получении полно-размерных кДНК из-за их нестабильности в клетках *E. coli*, использование плазмид, транскрипция которых происходит в ядре эукариотических клеток, что может привести к деградации или инактивации инфекционной геномной РНК в ядре, возможным проблемам при транспорте РНК в цитоплазму, а также отсутствие данных о длительности персистенции инфекционных геномных РНК.

РНК-вакцины

В настоящее время для создания РНК-вакцин применяются два основных подхода: 1) использование нереплицирующейся мРНК, кодирующей, как правило, только один антиген; 2) получение самоамплифицирующегося РНК-репликона из одноцепочечных (+/-)РНК вирусов, в геноме которых структурные гены заменены на гены, кодирующие необходимые антигены и РНК-полимеразу [8, 22, 23].

мРНК-вакцины

Вакцины на основе мРНК получают путем транскрипции *in vitro* из линейной ДНК-матрицы, в качестве которой выступает плаزمид, с использованием различных РНК-полимераз бактериофагов. Синтезированная мРНК помимо кодирующей последовательности должна содержать кэп-структуру на 5'-конце, UTR и полиаденилирование на 3'-конце (рис. 2), необходимые для эффективной трансляции, защиты мРНК от экзонуклеаз и правильного сплайсинга транскрипта.

Существуют два основных подхода к добавлению кэп-структуры на 5'-конец мРНК. Первый основан на использовании ферментов вируса коровьей оспы, один из которых добавляет m⁷GpppN, а второй — 2-О-метильную группу к предпоследнему нуклеотиду, в результате формируется 5'-кэп, идентичный по структуре эукариотическим мРНК. Второй, наиболее часто используемый подход, заключается во включении синтетических аналогов (например, антиреверсные ARCAs или m₂^{7,3'-O}GpppG) при транскрипции *in vitro* [24–27].

Добавление UTR, содержащих различные регуляторные элементы, используется для повышения эффективности трансляции и повышения стабильности мРНК. Например, введение 3'-UTR гена α-глобина или 5', 3'-UTR гена β-глобина стабилизирует мРНК [24, 26, 28]. В случаях необходимости быстрой деградации мРНК в 3'-UTR могут включаться элементы, богатые аденин-урацил последовательностями [29]. Поли(А)-хвост может быть сконструирован путем введения последовательностей тими-на в ДНК, что является более предпочтительным подходом, так как использование рекомбинантной поли(А)-полимеразы для удлинения транскрибированной РНК *in vitro* после транскрипции часто приводит к образованию поли(А)-хвостов различной длины.

Еще одним способом «улучшить» свойства мРНК-вакцин является использование химически модифицированных нуклеотидов. Например, включение модифицированного псевдоуридина повышает стабильность и трансляцию РНК, также включение химически модифицированных нуклеотидов приводит к снижению иммуногенности векторов [28].



Рис. 2. Структурные элементы РНК-вакцин [30, 31]: а — мРНК вакцина состоит из кэп-структуры на 5'-конце, 5'-UTR, открытой рамки считывания (ORF), кодирующей протективный антиген, 3'-UTR и полиаденилированный 3'-конец; б — самоамплифицирующиеся РНК-вакцины, как правило, создаются из генома альфавирусов, в котором остаются неструктурные гены (nsp), а структурные гены (капсида и E2/E1) заменены на чужеродный ген (GOI).

Fig. 2. Structural elements of RNA vaccines [30, 31]: a — an mRNA vaccine consists of a cap structure at the 5'-end, 5'-UTR, open reading frame (ORF) encoding the protective antigen, 3'-UTR, and polyadenylated 3'-end; b — self-amplifying RNA vaccines are generally created from an alphavirus genome which contains nonstructural genes (nsp), and in which structural genes (capsid and E2/E1) were replaced by a foreign gene (GOI).

³ <https://rega.kuleuven.be/cmt/jn/viruses/pllav-a-plasmid-based-live-attenuated-vaccine-technology>

⁴ https://www.who.int/immunization/research/forums_and_initiatives/gvirf/Johan_Neyts_2018.pdf?ua=1

⁵ <https://rabyd-vax.eu>

Самоамплифицирующиеся РНК-вакцины (РНК-репликоны)

РНК-репликоны получают путем замены структурных генов на гены, кодирующие антигены, и сохранением неструктурных генов, отвечающих за репликацию вируса. Также самоамплифицирующиеся РНК-вакцины содержат основные элементы мРНК-вакцин: кэп, 5'-UTR, 3'-UTR и поли(А)-хвост (рис. 2). Наиболее изученные РНК-репликоны были получены из геномов альфавирусов, таких как вирусы Синдбиса, леса Семлики и Венесуэльского энцефаломиелита лошадей [25, 30, 31]. После введения в эукариотические клетки РНК-репликон самоамплифицируется с использованием комплекса РНК-полимеразы репликона, при этом образование вирусных частиц невозможно из-за отсутствия структурных генов [25, 30]. Главным преимуществом применения технологии самоамплифицирующихся РНК является их способность к образованию большого количества антигена, и, соответственно, получение более сильного иммунного ответа, что позволит уменьшить вводимую дозу вакцины.

Регуляторные требования к ДНК- и РНК-вакцинам

Как уже было отмечено, в настоящее время в мире не лицензирована ни одна ДНК- и РНК-вакцина для профилактики инфекционных болезней, вместе с тем Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ) и некоторыми национальными регуляторными органами опубликованы руководящие принципы и руководства, рассматривающие требования и подходы к обеспечению качества ДНК- и РНК-вакцин и проведению их доклинических исследований. Руководящие принципы ВОЗ, опубликованные в 2007 г., содержат информацию и рекомендации для национальных регуляторных органов и производителей относительно контроля качества и доклинических исследований ДНК-вакцин⁶. Многие аспекты руководящих принципов могут применяться и к РНК-вакцинам, за исключением подходов к доклиническим исследованиям.

В США в 2005 г. Управление по контролю за качеством продуктов питания и лекарственных средств (FDA) разработало руководство «Considerations for plasmid DNA vaccines for infectious disease indications»⁷ («Вопросы, связанные с плазмидными ДНК-вакцинами, применяемыми для профилактики инфекционных заболеваний»), в котором содержатся рекомендации по описанию производственного процесса, тестированию и объему проведенных доклинических исследований, необходимых для получения разрешения на проведение клинических исследований [32].

В Европейском союзе на сегодняшний момент отсутствуют руководства для оценки качества и проведению доклинических и клинических исследований ДНК- и РНК-вакцин, за исключением документа Европейского агентства по лекарственным средствам (EMA) «Concept paper on guidance for DNA vaccines»⁸ («Документ-концепция для руководства по ДНК-вакцинам»), в котором содержится информация о необходимости разработки такого руководящего документа. Некоторые вопросы оценки качества и проведения доклинических исследований, которые могут быть применены к ДНК- и РНК-вакцинам, рассмотрены в «Guideline on the quality, non-clinical and clinical aspects of gene therapy medicinal products»⁹ («Руководство по качеству, докли-

ническим и клиническим аспектам разработки генотерапевтических препаратов»), но необходимо отметить, что в Европейском союзе согласно директиве комиссии 2009/120/EC¹⁰ от 14 сентября 2009 г. вакцины против инфекционных заболеваний не относятся к генотерапевтическим лекарственным препаратам.

В Российской Федерации также отсутствуют специализированные руководства и рекомендации по исследованию ДНК- и РНК-вакцин. Основные требования к качеству ДНК-вакцин отражены в Государственной фармакопее Российской Федерации (ГФ РФ) XIV издания¹¹.

Специализированных требований к качеству и доклиническим исследованиям безопасности и иммуногенности РНК-вакцин в настоящее время не разработано ни в одной стране мира. Частично это связано с тем, что многие подходы, применяемые для ДНК-вакцин, можно использовать и для РНК-вакцин, но создание новых технологий и увеличение количества клинических исследований РНК-вакцин, возможно, приведет к разработке такого специализированного документа.

Требования к оценке качества

Выбор показателей качества ДНК- и РНК-вакцин необходимо проводить с учетом используемого вектора, метода доставки, трансгена, физико-химических свойств вакцин, способа/пути введения, технологического процесса, а также требований ГФ РФ XIV издания. Нормы и аналитические методики, используемые для контроля качества вакцин, должны быть обоснованными, в том числе и валидационными данными.

В таблице 1 представлены показатели и методы, необходимые для оценки качества ДНК- и РНК-вакцин. Необходимо учитывать, что для оценки качества вакцины могут потребоваться дополнительные показатели качества, например для лиофилизатов необходима оценка потери в массе при высушивании, время растворения (диспергирования), для растворов — прозрачность, цветность, извлекаемый объем, механические включения и т. д.

Описание должно отражать характеристику вакцины с учетом ее физико-химических свойств, например для растворов для инъекций приводится характеристика прозрачности и цветности раствора, а для лиофилизатов — описание лиофилизированной массы и описание восстановленного раствора.

Выбор метода для определения подлинности должен зависеть от свойств и характеристик вакцины. Например, могут использоваться рестрикционный анализ (при этом выбор используемых рестриктаз будет зависеть от ДНК-конструкции), ПЦР, секвенирование, ВЭЖХ, капиллярный электрофорез, биологические *in vivo* или *in vitro* методы, позволяющие определить экспрессию антигена. Если в состав вакцины входят липиды, липоплексы или другие системы доставки, то их подлинность также должна подтверждаться соответствующими методами.

Специфическую активность можно оценить с помощью различных *in vivo* и/или *in vitro* методов с учетом предполагаемого применения, экспрессируемого антигена и его биологической активности. При наличии релевантной биологической модели предпочтительным методом является определение иммуногенности вакцины. Применение биологических методов *in vitro*, например методов измерения экспрессируемого антигена, должно коррелировать с иммуногенностью вакцины¹². Для

⁶ Guidelines for assuring the quality and nonclinical safety evaluation of DNA vaccines. WHO; 2007.

⁷ Guidance for industry: considerations for plasmid DNA vaccines for infectious disease indications. FDA; 2007.

⁸ Concept paper on guidance for DNA vaccines (EMA/CHMP/308136/2007). EMA; 2007.

⁹ Guideline on the quality, non-clinical and clinical aspects of gene therapy medicinal products (EMA/CAT/80183/2014). EMA; 2018.

¹⁰ Commission Directive 2009/120/EC. https://ec.europa.eu/health/sites/health/files/eudralex/vol-1/dir_2009_120/dir_2009_120_en.pdf

¹¹ Общая фармакопейная статья 1.7.1.0013.18 ДНК-вакцины. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2; 2018.

¹² Guidelines for assuring the quality and nonclinical safety evaluation of DNA vaccines. WHO; 2007.

Guidance for industry: considerations for plasmid DNA vaccines for infectious disease indications. FDA; 2007.

Таблица 1. Перечень показателей и методов, необходимых для оценки качества ДНК- и РНК-вакцин
Table 1. Test parameters and test methods used for the quality control of DNA and RNA vaccines

ДНК-вакцины DNA vaccines		РНК-вакцины RNA vaccines	
Показатель Test parameter	Метод Test method	Показатель Test parameter	Метод Test method
Описание Appearance	Визуальный Visual method	Описание Appearance	Визуальный Visual method
Подлинность: • плазмиды • системы доставки (в случае использования) Identification: • plasmids • delivery systems (if used)	рестрикционный анализ, ПЦР, секвенирование, капиллярный электрофорез, ВЭЖХ, ИФА, биологический и др.; в зависимости от системы доставки restriction analysis, PCR, sequencing, capillary electrophoresis, HPLC, EIA, biological analysis, etc.; depending on the delivery system used	Подлинность: • плазмиды • системы доставки (в случае использования) Identification: • plasmids • delivery systems (if used)	ПЦР, ВЭЖХ, капиллярный электрофорез, биологический и др.; в зависимости от системы доставки PCR, HPLC, capillary electrophoresis, biological analysis, etc.; depending on the delivery system used
Специфическая активность: • количество действующего вещества в одной дозе • иммуногенность Specific activity: • amount of the active ingredient in one dose • immunogenicity	ВЭЖХ, капиллярный электрофорез, спектрофлуориметрия и др.; биологический, ИФА и др. HPLC, capillary electrophoresis, spectrofluorometry, etc.; biological analysis, EIA, etc.	Специфическая активность: • количество действующего вещества в одной дозе • иммуногенность Specific activity: • amount of the active ingredient in one dose • immunogenicity	QuantiGene, спектрофлуориметрия и др.; биологический, ИФА и др. QuantiGene, spectrofluorometry, etc.; biological analysis, EIA, etc.
Чистота: • остаточные белки клетки-хозяина • остаточная ДНК штамма-продуцента • остаточная РНК • родственные примеси (конформационная форма плазмиды) • примеси (антибиотики, остаточные органические примеси и др.) Purity: • residual host cell proteins • residual host cell DNA • residual RNA • related substances (plasmid conformational form) • impurities (antibiotics, residual organic impurities, etc.)	ИФА и др.; Threshold, количественная ПЦР и др.; ВЭЖХ и др.; ВЭЖХ или капиллярный электрофорез; в зависимости от примесей EIA, etc.; Threshold, quantitative PCR, etc.; HPLC, etc.; HPLC or capillary electrophoresis; depending on the type of impurity	Чистота: • остаточные белки (клетки-хозяина, ДНК-азы, РНК-полимеразы) • остаточная ДНК • примеси (РНК-полимераза, антибиотики, остаточные органические примеси и др.) Purity: • residual proteins (of the host cell, DNase, RNA polymerase) • residual DNA • impurities (RNA polymerase, antibiotics, residual organic impurities, etc.)	ИФА и др.; Threshold, количественная ПЦР и др.; в зависимости от примесей EIA, etc.; Threshold, quantitative PCR, etc.; depending on the type of impurity
Стерильность Sterility	Метод прямого посева или мембранной фильтрации Direct inoculation method or membrane filtration	Стерильность Sterility	Метод прямого посева или мембранной фильтрации Direct inoculation method or membrane filtration
Пирогенность или Бактериальные эндотоксины Pyrogenicity or Bacterial endotoxins	Биологический или ЛАЛ-тест Biological analysis or LAL test	Пирогенность или Бактериальные эндотоксины Pyrogenicity or Bacterial endotoxins	Биологический или ЛАЛ-тест Biological analysis or LAL test
Аномальная токсичность Abnormal toxicity	Биологический Biological analysis	Аномальная токсичность Abnormal toxicity	Биологический Biological analysis

ДНК-вакцин, плазмиды которых кодируют геном аттенуированного вируса, возможно определение показателя биологической активности методами титрования на культурах клеток либо при постановке ПЦР.

Для определения количественного содержания плазмиды или РНК в вакцине наиболее часто используются спектрофотометрические методы (по отношению поглощения при длинах волн 260/280 нм для ДНК и 260/230 нм для РНК). Однако использование различных систем доставки будет затруднять применение таких методов, поэтому потребуются разработать способы, обеспечивающие разрушение используемых систем доставки.

Для ДНК-вакцин важным является определение конформационной формы плазмиды, так как плазмидная ДНК может присутствовать в трех формах (суперскрученная, открытая кольцевая и линейная), и данные об их относительной активности *in vivo* недостаточны. Считается, что содержание суперскрученной формы должно быть не менее 80 % относительно всех форм, но выбор нормы должен быть обоснован с учетом возможного влияния на эффективность.

В ДНК- и РНК-вакцинах основными примесями будут являться остаточные ДНК, РНК и белки клеток хозяина, антибиотик, добавляемые в питательную среду, ферменты (РНК-полимеразы, РНК-азы, ДНК-азы и др.), специфические химические примеси, связанные с системой доставки, и остаточные органические примеси. Выбор испытаний и методик для оценки чистоты может быть основан на анализе рисков (например, высокое содержание остаточной ДНК или РНК будет приводить к иммуотоксичности) и способности к последовательному удалению примесей в процессе производства. Возможно проведение испытаний на определенных этапах производства и при контроле фармацевтической субстанции.

Для обеспечения единообразия и минимизации возможных отклонений, в первую очередь при определении подлинности и специфической активности (иммуногенности) ДНК- и РНК-вакцин, необходимо использование стандартных образцов. В настоящее время отсутствуют специализированные международные стандартные образцы для данных типов вакцин, поэтому в качестве стандартного образца рекомендуется использовать стандартный образец предприятия (СОП), в качестве которого могут быть использованы образцы одной серии вакцины либо промежуточного продукта вакцины. Кандидатный образец в СОП должен быть охарактеризован по составу, чистоте, специфической активности и другим характеристикам для обеспечения целей испытаний¹³.

Особенности проведения доклинических исследований

Целью доклинических исследований ДНК- и РНК-вакцин является исследование безопасности и иммунологических свойств на соответствующих *in vivo* и *in vitro* моделях. По возможности следует использовать релевантные виды животных, иммунобиологический ответ которых на вводимый вектор и экспрессируемый антиген будет аналогичен ответу у людей. Доклинические исследования ДНК- и РНК-вакцин должны соответствовать общим требованиям и принципам доклиниче-

ских исследований вакцин с учетом используемой технологии создания вектора, выбранной конструкции вектора, системы доставки и способа введения¹⁴.

Потенциальные проблемы безопасности ДНК- и РНК-вакцинации связывают с: 1) возможной интеграцией плазмидной ДНК в хромосомы клеток человека, тем самым увеличивая риск канцерогенеза или других генетических аномалий; 2) развитием иммунопатологических реакций и рисков, связанных с образованием аутоантител против плазмидной ДНК, потенциально вызывая или ускоряя развитие системных аутоиммунных заболеваний (таких как системная красная волчанка), либо индуцированием местного воспалительного ответа против трансформированных клеток, экспрессирующих кодируемый вакциной антиген, способствуя развитию органоспецифического аутоиммунного заболевания, либо экспрессией цитокинов или костимуляторных факторов, используемых как адъюванты; 3) развитием толерантности к секретируемому антигену; 4) продолжительностью экспрессии антигена; 5) рисками, связанными с экспрессией других последовательностей гена в клетках млекопитающих или бактерий¹⁵ [33].

Исследования по изучению распределения и длительности присутствия сконструированных плазмид или РНК в организме животных необходимо проводить в различных тканях и нескольких временных точках в диапазоне от нескольких суток до нескольких месяцев после введения. Как правило, биораспределение оценивается в крови, сердце, мозге, печени, почках, легких, костном мозге, половых железах, лимфатических узлах, селезенке, кишечнике и месте введения. Выбор временных интервалов определения количественного содержания векторов должен быть обоснован с учетом того, что в естественных местах персистенция плазмид редко бывает длительной, в то время как в месте введения они могут обнаруживаться до 2 месяцев, а иногда и до 6 месяцев¹⁶ [33]. Для РНК-вакцин длительность персистенции часто не превышает нескольких суток [34]. Также может потребоваться исследование продолжительности экспрессии, фармакокинетики антигенов и распределения, выведения системы доставки¹⁷.

В случае использования системы доставки, направленной на определенную ткань или орган за счет использования специфических лигандов и/или использования тканеспецифических промоторов, необходимо оценивать желаемый тропизм и целевую селективность.

Необходимо отметить, что ДНК-вакцины, сходные по структуре вектора и отличающиеся только трансгенами, имеют схожий профиль биораспределения. Следовательно, возможно использование данных ранее проведенных исследований. В случае изменения вектора, системы доставки, способа введения или любых других модификаций, влияющих на поглощение клеткой и/или биораспределение, необходимо проводить новые исследования¹⁸.

Методики, используемые для определения биораспределения и персистенции, должны быть валидованными, обладать необходимой чувствительностью и специфичностью. Согласно рекомендациям FDA чувствительность метода количественной

¹³ Там же.

¹⁴ Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств (иммунобиологические лекарственные препараты). Ч. 2. М.: Гриф и К; 2012.

WHO guidelines on nonclinical evaluation of vaccines. WHO; 2005.

Guidelines on the nonclinical evaluation of vaccine adjuvants and adjuvanted vaccines. WHO, 2013.

Guideline on clinical evaluation of new vaccines (EMA/CHMP/VWP/164653/2005). EMA; 2006.

¹⁵ Guidelines for assuring the quality and nonclinical safety evaluation of DNA vaccines. WHO; 2007.

¹⁶ Там же.

¹⁷ Там же.

¹⁸ Guidance for industry: considerations for plasmid DNA vaccines for infectious disease indications. FDA; 2007.

ПЦР должна быть не менее 100 копий плазмид на 1 мкг ДНК¹⁹. Для определения концентрации РНК могут использоваться наборы QuantiGene (ThermoFisher, США) или аналогичные.

Вероятность встраивания плазмид в хромосому очень низкая, и на сегодняшний день имеется мало доказательств интеграции [33, 35]. Однако включение в конструкцию вектора гомологичных последовательностей, длительная персистенция плазмиды и ее высокая концентрация, использование электростимуляции для доставки или одновременное введение с плазмидой, кодирующей фактор роста, могут привести к увеличению риска интеграции плазмидной ДНК в хромосому. В случае выявленных рисков необходимо проведение исследований, подтверждающих отсутствие интеграции плазмиды в хромосому²⁰.

Токсикологические исследования должны проводиться с учетом предполагаемой дозы, схемы введения, состава и способа введения препарата. Количество доз должно соответствовать или превышать предполагаемое их количество в клинических исследованиях. Исследования необходимо проводить на иммуночувствительных видах животных. Включение приматов, трансгенных мышей или других видов животных может потребоваться при ожидаемой видоспецифичной токсичности и при наличии в векторе ДНК-вакцины генов цитокинов²¹.

Исследования генотоксичности могут потребоваться при наличии специфических примесей или нового химического компонента (например, нового компонента системы доставки), которые не были изучены ранее²². При обнаружении ДНК- или РНК-вакцин в тканях гонад может потребоваться изучение фертильности и общей репродуктивной функции. Кроме того, могут потребоваться исследования эмбриофетальной и перинатальной токсичности в случае включения в целевую популяцию клинического применения женщин с детородным потенциалом²³.

Оценку иммуногенности ДНК- и РНК-вакцин необходимо проводить на релевантных видах животных. Выбор конкретного вида животного, помимо его чувствительности к патогену, может также зависеть от типа вектора, наличия адъюванта, типа предполагаемого иммунного ответа (клеточный или гуморальный), способа введения или наличия в плазмиде генов, кодирующих белки человека (например, цитокины или факторы роста). В отдельных случаях возможно проведение дополнительных исследований с использованием «гомологичного препарата», то есть с использованием ДНК-вакцины, в плазмиде которой гены, кодирующие белки человека, заменены на аналогичные гены, кодирующие белки выбранного вида животного. Оценка иммуногенности в зависимости от индуцированного иммунного ответа может быть основана на определении средних геометрических титров антител, факторе сероконверсии, титров вируснейтрализующих антител и/или клеточного ответа. При использовании гетерологичной «прайм-буст» вакцинации оценку иммуногенности необходимо проводить с учетом предполагаемой схемы вакцинации.

Заключение

Использование рекомбинантных ДНК и РНК все еще представляет собой относительно новый способ создания вакцин. И, несмотря на неудачи проведенных клинических исследований ДНК-вакцин, а также то, что многие РНК-вакцины все еще

находятся на стадии разработки, данные технологии имеют высокий потенциал. В первую очередь, это связано с простотой и универсальностью создания плазмид/РНК и технологического процесса, как правило, основанного на культивировании *E. coli*. В последние годы возрождение интереса к ДНК- и РНК-вакцинам связано с успехами применения плазмид и РНК в генной терапии, а также созданием более эффективных генетических конструкций, улучшением технологий доставки и появлением новых перспективных технологий (iDNA, PPLAV, самоамплифицирующиеся РНК). Таким образом, подходы, основанные на применении ДНК- и РНК-вакцин, в случае решения проблемы их низкой иммуногенности у людей являются реальной альтернативой для будущего развития медицины в профилактике инфекционных заболеваний.

Благодарности. Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00154-19-00 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР АААА-А18-118021590046-9).

Acknowledgments. The study reported in this publication was carried out as part of a publicly funded research project No. 056-00154-19-00 and was supported by the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (R&D public accounting No. АААА-А18-118021590046-9).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Conflict of interest. Authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

Литература/References

1. Tang DC, DeVit M, Johnston SA. Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response. *Nature*. 1992;356(6365):152–4. <https://doi.org/10.1038/356152a0>
2. Ulmer JB, Donnelly JJ, Parker SE, Rhodes GH, Felgner PL, Dworki VJ, et al. Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein. *Science*. 1993;259(5102):1745–9. <https://doi.org/10.1126/science.8456302>
3. Donnelly JJ, Ulmer JB, Shiver JW, Liu MA. DNA vaccines. *Annu Rev Immunol*. 1997;15:617–48. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.15.1.617>
4. Gurunathan S, Klinman DM, Seder RA. DNA vaccines: immunology, application, and optimization. *Annu Rev Immunol*. 2000;18:927–74. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.18.1.927>
5. Hobernik D, Bros M. DNA vaccines — how far from clinical use? *Int J Mol Sci*. 2018;19(11):3605. <https://doi.org/10.3390/ijms19113605>
6. Liu MA, Ulmer JB. Human clinical trials of plasmid DNA vaccines. *Adv Genet*. 2005;55:25–40. [https://doi.org/10.1016/S0065-2660\(05\)55002-8](https://doi.org/10.1016/S0065-2660(05)55002-8)
7. Weniger BG, Anglin IE, Tong T, Pensiero M, Pullen JK, Nucleic Acid Delivery Devices for HIV Vaccines Workshop Group. Workshop report: nucleic acid delivery devices for HIV vaccines: workshop proceedings, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, Bethesda, Maryland, USA, May 21, 2015. *Vaccine*. 2018;36(4):427–37. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2017.10.071>
8. Pardi N, Hogan MJ, Porter FW, Weissman D. mRNA vaccines — a new era in vaccinology. *Nat Rev Drug Discov*. 2018;17(4):261–79. <https://doi.org/10.1038/nrd.2017.243>

¹⁹ Там же.

²⁰ Guidelines for assuring the quality and nonclinical safety evaluation of DNA vaccines. WHO; 2007.

²¹ Там же.

Guidance for industry: considerations for plasmid DNA vaccines for infectious disease indications. FDA; 2007.

²² Guidelines for assuring the quality and nonclinical safety evaluation of DNA vaccines. WHO; 2007.

²³ Guidance for industry: considerations for plasmid DNA vaccines for infectious disease indications. FDA; 2007.

9. Kumaragurubaran K, Kaliaperumal K. DNA vaccine: the miniature miracle. *Vet. World*. 2013;6(4):228–32. <https://doi.org/10.5455/vetworld.2013.228-232>
10. Cranenburgh R. Development of the ideal DNA vaccine requires the optimization of delivery strategies and plasmid vectors. *BioPharm International*. 2011;2011 Suppl.(7). <http://www.biopharminternational.com/dna-vaccine-delivery>
11. Garmory HS, Brown KA, Titball RW. DNA vaccines: improving expression of antigens. *Genet Vaccines Ther*. 2003;1:2. <https://doi.org/10.1186/1479-0556-1-2>
12. Li L, Petrovsky N. Molecular mechanisms for enhanced DNA vaccine immunogenicity. *Expert Rev Vaccines*. 2016;15(3):313–29. <https://doi.org/10.1586/14760584.2016.1124762>
13. Liu Z, Chen O, Wall JBJ, Zheng M, Zhou Y, Wang L, et al. Systematic comparison of 2A peptides for cloning multi-genes in a polycistronic vector. *Sci Rep*. 2017;7(1):2193. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-02460-2>
14. Li L, Petrovsky N. Molecular adjuvants for DNA vaccines. *Curr Issues Mol Biol*. 2017;22:17–40. <https://doi.org/10.21775/cimb.022.017>
15. Darquet AM, Cameron B, Wils P, Scherman D, Crouzet J. A new DNA vehicle for nonviral gene delivery: supercoiled minicircle. *Gene Ther*. 1997;4:1341–9. <https://doi.org/10.1038/sj.gt.3300540>
16. Hardee CL, Arévalo-Soliz LM, Hornstein BD, Zechiedrich L. Advances in non-viral DNA vectors for gene therapy. *Genes (Basel)*. 2017;8(2):65. <https://doi.org/10.3390/genes8020065>
17. Stenler S, Blomberg P, Smith CE. Safety and efficacy of DNA vaccines: plasmids vs. minicircles. *Hum Vaccin Immunother*. 2014;10(5):1306–8. <https://doi.org/10.4161/hv.28077>
18. Riede O, Seifert K, Oswald D, Endmann A, Hock C, Winkler A, et al. Preclinical safety and tolerability of a repeatedly administered human leishmaniasis DNA vaccine. *Gene Therapy*. 2015;22(8):628–35. <https://doi.org/10.1038/gt.2015.35>
19. Pushko P, Ишмухаметов АА, Bredenbeek PP, Lukashovich IS. Экспериментальные живые аттенуированные вакцины против желтой лихорадки на основе инфекционных ДНК. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2019;18(1):18–25. [Pushko P, Ishmukhametov AA, Bredenbeek PP, Lukashovich IS. Experimental DNA-launched live-attenuated vaccines against yellow fever. *Épidemiologiā i vakcinoprofilaktika = Epidemiology and Vaccinal Prevention*. 2019;18(1):18–25 (In Russ.)] <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2019-18-1-18-25>
20. Pushko P, Lukashovich IS, Weaver SC, Tretyakova I. DNA-launched live-attenuated vaccines for biodefense applications. *Expert Rev Vaccines*. 2016;15(9):1223–34. <https://doi.org/10.1080/14760584.2016.1175943>
21. Dallmeier K, Neyts J. Bacterial artificial chromosomes. Patent WIPO N WO2014174078; 2014.
22. Ulmer JB, Mason PW, Geall A, Mandl CW. RNA-based vaccines. *Vaccine*. 2012;30(30):4414–8. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.04.060>
23. Lundstrom K. RNA-based drugs and vaccines. *Expert Rev Vaccines*. 2015;14(2):253–63. <https://doi.org/10.1586/14760584.2015.959932>
24. Sahin U, Karikó K, Türeci Ö. mRNA-based therapeutics — developing a new class of drugs. *Nat Rev Drug Discov*. 2014;13(10):759–80. <https://doi.org/10.1038/nrd4278>
25. Geall AJ, Mandl CW, Ulmer JB. RNA: the new revolution in nucleic acid vaccines. *Semin Immunol*. 2013;25(2):152–9. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2013.05.001>
26. Weissman D. mRNA transcript therapy. *Expert Rev Vaccines*. 2015;14(2):265–81. <https://doi.org/10.1586/14760584.2015.973859>
27. Youn H, Chung JK. Modified mRNA as an alternative to plasmid DNA (pDNA) for transcript replacement and vaccination therapy. *Expert Opin Biol Ther*. 2015;15(9):1337–48. <https://doi.org/10.1517/14712598.2015.1057563>
28. Lundstrom K. Latest development on RNA-based drugs and vaccines. *Future Sci OA*. 2018;4(5):FSO300. <https://doi.org/10.4155/fsoa-2017-0151>
29. Eberhardt W, Doller A, Akool el-S, Pfeilschifter J. Modulation of mRNA stability as a novel therapeutic approach. *Pharmacol Ther*. 2007;114(1):56–73. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2007.01.002>
30. Atkins GJ, Fleeton MN, Sheahan BJ. Therapeutic and prophylactic applications of alphavirus vectors. *Expert Rev Mol Med*. 2008;10:e33. <https://doi.org/10.1017/S1462399408000859>
31. Brito LA, Kommareddy S, Maione D, Uematsu Y, Giovani C, Berlanda Scorza F, et al. Self-amplifying mRNA vaccines. *Adv Genet*. 2015;89:179–233. <https://doi.org/10.1016/bs.adgen.2014.10.005>
32. Klinman DM, Klaschik S, Tross D, Shirota H, Steinhagen F. FDA guidance on prophylactic DNA vaccines: analysis and recommendations. *Vaccine*. 2010;28(16):2801–5. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.11.025>
33. Klug B, Reinhardt J, Robertson J. Current status of regulations for DNA vaccines. In: Thalhamer J, Weiss R, Scheibhofer S, eds. *Gene Vaccines*. New York: Springer; 2012. P. 285–95. https://doi.org/10.1007/978-3-7091-0439-2_14
34. Bahl K, Senn JJ, Yuzhakov O, Bulychiev A, Brito LA, Hassett KJ, et al. Preclinical and clinical demonstration of immunogenicity by mRNA vaccines against H10N8 and H7N9 influenza viruses. *Mol Ther*. 2017;25(6):1316–27. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2017.03.035>
35. Ledwith BJ, Manam S, Troilo PJ, Barnum AB, Pauley CJ, Griffiths TG 2nd. Plasmid DNA vaccines: assay for integration into host genomic DNA. *Dev Biol*. 2000;104:33–43.

Об авторах / Authors

Горяев Артем Анатольевич, канд. биол. наук. *Artem A. Goryaev*, Cand. Sci. (Biol.). **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0003-1620-6233>

Савкина Мария Владимировна, канд. биол. наук. *Maria V. Savkina*, Cand. Sci. (Biol.). **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0002-8527-2157>

Обухов Юрий Иванович. *Yuri I. Obukhov*. **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0002-7729-9800>

Меркулов Вадим Анатольевич, д-р мед. наук, проф. *Vadim A. Merkulov*, Dr. Sci. (Med.), Professor. **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0003-4891-973X>

Олефир Юрий Витальевич, д-р мед. наук, ст. науч. сотр. *Yuri V. Olefir*, Dr. Sci. (Med.), Senior Research Associate. **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0001-7652-4642>

Поступила 01.04.2019

После доработки 16.05.2019

Принята к публикации 16.05.2019

Received 1 April 2019

Revised 16 May 2019

Accepted 16 May 2019